

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790358
 研究課題名（和文）PHA2型の原因遺伝子であるWNK及びそのシグナル伝達経路の包括的解析
 研究課題名（英文）The comprehensive analysis of WNK, the causative gene of PHA2, and WNK signaling pathway
 研究代表者
 佐藤 淳（SATO ATSUSHI）
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
 研究者番号：30451925

研究成果の概要（和文）：偽性低アルドステロン症 II 型（PHAII）の原因遺伝子として WNK1 及び WNK4 が単離され、PHAII で見られる高血圧症は、WNK シグナル伝達経路の制御異常によることが明らかになった。しかし、他の精神発達遅延等の病態に関しては、未だ発症メカニズムが解明されていない。我々は、WNK シグナル伝達経路の新規下流因子として、神経分化に関わる Lhx8/Awh を単離したが、その制御機構のより詳細な解明を目指し、ショウジョウバエを用いたスクリーニングを行い、発症メカニズムの解明を目指した。

研究成果の概要（英文）：WNK1 and WNK4 have been linked to a hereditary form of human hypertension known as Pseudohypoaldosteronism type II (PHAII). We identified that the malfunction of this regulation caused PHAII in mouse. However, this misregulation cannot cause all of pathological conditions of PHAII, such as a mental retardation. We already identified Lhx8/Awh as a new downstream target of WNK signaling pathway. For studying the detail mechanism of WNK signaling pathway, we started to screen the interacting factor(s) using *Drosophila melanogaster*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子発生遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学・分子病態学

キーワード：WNK、偽性低アルドステロン症 II 型、ショウジョウバエ（モデル生物）

1. 研究開始当初の背景

特定疾患にも指定されている偽性低アルドステロン症（pseudohypoaldosteronism：PHA）の患者は、アルドステロンの分泌不全が疑われる症状を示すが、実際には血中のアルドステロン濃度は低下していない。PHA は I 型と II 型に分けられるが、II 型は主に 10 から 20 歳代で発症し、主要な所見は低レニン性高血圧症で、さらに歯や骨の発育不全、精神発達遅延、身体の奇形を伴う。PHAII

型は常染色体優性の遺伝形式を取り、原因遺伝子として、プロテインキナーゼ WNK1 及び WNK4 が同定された（Wilson et al., Science, 293:1107-1112, 2001）。

PHAII 型の病態の内、高血圧症の発症については、まず WNK4 が腎臓で塩化ナトリウムの再吸収及びカリウムの排泄を調節することが示された（Kahle et al., Nature Genetics, 35:372-376, 2003）。また当研究室では、WNK1 結合因子として STE20 様プロ

テインキナーゼ SPAK/OSR1 を同定し、WNK1→SPAK/OSR1→Na,K,Cl 共輸送体というシグナル伝達経路が存在することを示した (Moriguchi et al., *J. Biol. Chem.*, 280:42685-42693, 2005)。この経路は、線虫でも進化的に保存されている (Choe and Strange, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 293:C915-927, 2007)。さらに、PHAI型と同様の変異を持つ WNK4 を強制発現するトランスジェニックマウスは PHAI型と同様の高血圧症を示し、WNK4 による SPAK/OSR1 を介した共輸送体の制御が発症に重要であった (Lalioti et al., *Nature Genetics*, 38:1124-1132, 2006; Yang et al., *Cell Metabolism*, 5:331-344, 2007)。以上のような結果から、PHAI型の病態の内、高血圧症の発症における WNKシグナル伝達経路の重要性が確かめられた。

一方、PHAI型の歯や骨の発育不全、精神発達遅延、身体の奇形といった他の病態の発症機構は未知のままである。近年、WNK1 欠損マウスは胚性致死であること (Zambrowicz et al., *PNAS*, 100: 14109-14114, 2003)、WNK1 が血管新生、心臓の発生に必須であることが示された (Xie et al., *Am. J. Pathol.*, 175:1315-1327, 2009)。また、WNK1 欠損線虫も 2 令幼虫期で致死であり (Hisamoto et al., *EMBO Report*, 9:70-75, 2008; Choe and Strange, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 293:C915-927, 2007)、WNK1 は、SPAK/OSR1 経路の制御に加え、発生・分化にも深く関与していることが推定された。これは、PHAI型の歯や骨の発育不全、精神発達遅延などの病態の発症機構にも WNK が関与する可能性を示唆している。私は、ショウジョウバエをモデル生物として WNK の発生・分化に関わる機能解析を行い、また、ショウジョウバエの利点である遺伝学を駆使して、WNKシグナル伝達経路に関わる新規因子を探索し、新規下流因子 Lhx8/Awh を単離した。Lhx8 は、アセチルコリン性神経の分化に関与する等、PHAIの病態を考え合わせると、非常に重要な因子であると考えられるが、その詳細な機構や役割は未知のままである。

2. 研究の目的

PHAI型の発症機構のより詳細な解析に寄与すべく、私は、ショウジョウバエを用いた WNK の機能解析から、新規下流因子 Lhx8/Awh を単離した。しかし、WNK-Lhx8 経路の機能や、その制御機構は、いまだ未知のままである。特に WNKシグナル伝達経路は、WNK-SPAK/OSR1 以外に構成因子が見つかっていないなど、分かっていないことがあまりに多い。このため、WNKシグナル伝

達経路の制御機構や下流因子など、包括的な解析を行い、発症メカニズムの解明に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

WNK-Lhx8 経路の機能を探索するため、培養細胞を用いた実験を行うと共に、ショウジョウバエを用いた新規 WNK 関連因子のスクリーニングを行なうために、以下のような方法を用いた。

(1) 培養細胞系を用いた解析

① siRNA を用いたノックダウン

培養細胞に siRNA を導入することにより、*WNK1* 及び *WNK4*、*Lhx8* を knock-down し、下流因子の発現、リン酸化などを、Western Blotting、RT-PCR 等を用いて解析した。

② 強制発現

CMV プロモーター配列の下流に cDNA がないだコンストラクトを作製し、そのコンストラクトを培養細胞に導入することで、強制発現を行い、下流因子の発現、リン酸化などを Western Blotting、RT-PCR 等を用いて解析した。

(2) ショウジョウバエを用いた解析

① 異所発現系

酵母の Gal4-UAS システムを利用した異所発現系を構築し、Gal4 系統との掛け合わせ、抗体染色や成虫での表現型の観察を行う。

② モザイク解析

酵母の酵素である Flipase (Flp) とその認識配列である FRT を利用することで、染色体組換えを人為的に起こし、致死変異体の発生・分化における表現型を確認できる。DWNK の得られた変異体を用いて、FRT 配列を持つハエと組換えを起こさせることで、DWNK 変異及び FRT 配列の両方を持つハエを作製する。マーカー (GFP 等) と FRT 配列を持つハエを掛け合わせ、Flp を供給することで組換えを誘導し、成虫における表現型、成虫原基におけるマーカー遺伝子の発現の解析を行った。

③ スクリーニング

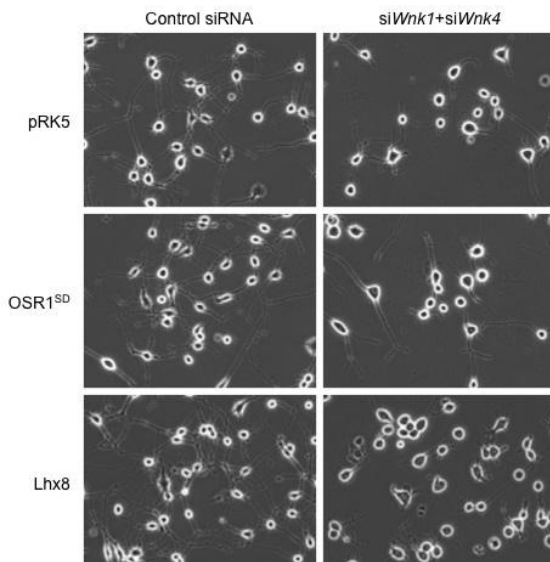
突然変異導入試薬として、EMS を用いた。羽化後 3 日の雄の成虫 20 匹を、6 時間、飢餓状態においた後、1%スクロース溶液にとかけた EMS を 16 時間、食べさせた。その後、未交尾の雌 20 匹と交配し、次の世代の成虫を用いて、スクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) Neuro2A 細胞を用いた分化決定機構の解析

Lhx8 は、口腔部位の分化 (Grigoriou et al., *Development*, 125:2063-2074, 1998; Zhang et al., *Orthod. Craniofacial Res.*, 5:65-70, 2002) において重要な機能を担っていることが知られているが、それ以外にアセチルコリン性神経の分化 (Zhao et al., *PNAS*, 100:9005-9010, 2003) に関与することが知られている。マウス神経芽細胞腫由来の細胞株である Neuro2A 細胞は、血清飢餓及びレチノイン酸の添加により、神経へと分化する。まず *Lhx8* のノックダウンにより、アセチルコリン性神経のマーカー遺伝子である *ChAT* の発現が下がることを確認した。*WNK1* および *WNK4* のノックダウンにより、*Lhx8* のノックダウンと同様、*ChAT* の発現が減少していた。また、分化させた Neuro2A 細胞において、*WNK* 下流因子である *OSR1* の恒常的活性型を強制発現させると、*Lhx8* の発現を誘導でき、*WNK1* 及び *WNK4* のノックダウンの効果を回復させることができた。以上の結果から、*WNK* シグナル伝達経路が、アセチルコリン性神経の分化に対し、非常に重要な機能を持っていることが分かった。

また、Neuro2A 細胞が分化する際には、神経突起を伸長させるが、*Lhx8* 及び、*WNK1* と *WNK4* のノックダウンでは、この伸長が阻害されていた。*OSR1* の恒常的活性型により、*WNK1* と *WNK4* のノックダウンによる伸長阻害は回復できたことから、神経突起の伸長にも *WNK*-*OSR1*-*Lhx8* 経路が関与していると考えられる。

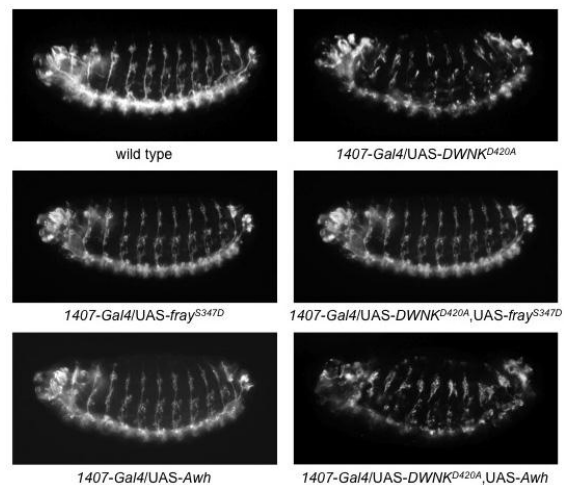


しかしながら、*WNK1* 及び *WNK4* のノックダウンによるアセチルコリン性神経への分化阻害や神経突起の伸長阻害は、*Lhx8* の共発現では回復できなかった。このことは、*WNK* シグナル伝達経路の下流で、*Lhx8* 以外

の因子も関与していることが示唆される。*Lhx8* と関与が報告されている、*Lhx6*、*Isl1* などの因子を確認したが、現在のところ、他の因子を特定できていない。

(2) ショウジョウバエにおける *WNK* シグナル伝達経路の神経系への関与

WNK-*OSR1*-*Lhx8* 経路が、神経の分化に関与していることから、ショウジョウバエにおいて、*WNK* シグナル伝達経路が神経系にどのように関与しているのかを解析した。*DWNK* 変異体は、胚期後期から2令幼虫初期までの間に徐々に死んで行くという表現型を示すため、胚期後期での末梢神経系を抗体染色により可視化したところ、軸索誘導がおかしくなっているという表現型を得た。そこで、優性阻害型 *DWNK* を神経前駆細胞から神経細胞特異的に過剰発現させたところ、軸索誘導がおかしくなっていることが判明した。この表現型は、*OSR* のショウジョウバエ相同遺伝子である *Fray* の恒常的活性型との共発現により回復したが、*Lhx8* の相同遺伝子である *Awh* の共発現では、回復できなかった。このことは、哺乳類出の結果と同様、ショウジョウバエにおいても、*WNK* シグナル伝達経路が神経分化に関与していることを示唆しており、また、*Lhx8*/*Awh* 以外の他の因子の関与も示唆している。



以上までの結果から、*WNK* シグナル伝達経路の新規下流因子 *Lhx8*/*Awh* を単離したこと、*WNK* シグナル伝達経路が神経分化に関与すること、精神発達遅延等の *PHAI1* の病態を考えると、この発見は *WNK* シグナル伝達経路が、高血圧症以外の病態にも関わる可能性を示した初めての結果であり、発症メカニズムの解明に繋がる第一歩であるという重要な発見であることを、原著論文として、*PLoS One* 誌にて、発表した (下記参照)。

(3) *WNK* シグナル伝達経路の制御機構の解析

上記までの結果により、WNK シグナル伝達経路が、Lhx8 を介して、神経分化に関与することが明らかになったが、WNK シグナル伝達経路の制御機構は未知のままである。このため、制御機構の解明のために、新規 WNK 関連因子のスクリーニングを下記の方法で行っている。

①異所発現系を用いたスクリーニング

ショウジョウバエの翅において、後部領域特異的に *DWNK* を過剰発現させると、異所的な翅脈の形成が見られる。この表現型は、WNK の下流因子である *fray* 及び *Awh* の変異体によって回復することを既に見出している。つまり、この表現型は、遺伝学的な背景により、表現型が変化し、かつ、その表現型が見やすく、スクリーニングの指標としやすい表現型であった。そこで、突然変異源として EMS を用い、網羅的なスクリーニングを行った。すでに 17000 を越える個体でスクリーニングを行い、表現型を促進する系統、抑制する系統を、計 49 系統、単離した。

②突然変異体を用いたスクリーニング

他のグループにより、*DWNK* 変異体が 3 種、取られていた (Berger et al. PLoS Genet 4(5): e1000085, 2008)。その内の 1 変異体と私が単離した変異体のヘテロ体では、蛹期致死の表現型を示した。*DWNK* の完全変異体では、2 令幼虫初期までに致死となることを考えると、この蛹期致死という表現型を指標にスクリーニングをできるのではないかと考えた。上記の異所発現系を用いたスクリーニングと同様、突然変異源として EMS を用い、網羅的なスクリーニングを行った。現在までに、1000 系統のスクリーニングを行い、蛹期致死をより早期の致死へと表現型を促進する系統や、蛹期致死から成虫まで生存するような表現型の抑制系統を、計 24 系統を単離した。

③新規 WNK 関連系統の原因遺伝子の探索

上記①及び②で単離した計 73 系統の原因遺伝子を特定するために、主要なマーカー遺伝子や P 因子系統からの組換え価の計算を行い、染色体上の位置の特定を行った。現在までに 4 系統で原因遺伝子が特定できており、今後、WNK シグナル伝達経路との関連を解析していく。

(4) WNK シグナル伝達経路と他のシグナル伝達経路との相互作用の解析

所属研究室において、アフリカツメガエルを用いた WNK シグナル伝達経路の解析から、WNK4 のノックダウンにより頭部欠損と言う表現型を示すことを見出した。頭部形成においては、FGF シグナル伝達経路が、軸情報

決定において非常に重要な役割を果たしているため、WNK との相互作用を解析した。その結果、WNK4 が FGF シグナル伝達経路の活性化に寄与していることを示すことができた。この結果は、WNK シグナル伝達経路が他のシグナル伝達経路と相互作用することを始めて示した結果であり、Genes to Cells 誌において、原著論文として発表した (下記参照)。

以上のように、本研究により、WNK シグナル伝達経路が、イオン共輸送隊を制御することによる血圧調節に関与する以外に、Lhx8/Awh を介して神経分化にも関与することを示した。この結果は、WNK シグナル伝達経路が、PHAI の病態の内、高血圧症のみならず、他の病態の発症にも関与する可能性を始めて示唆する結果であり、PHAI の発症メカニズムを解明する上で、非常に重要な結果であった。また、発症メカニズムの解明のためにも、WNK シグナル伝達経路の詳細な制御機構の解明というのは非常に重要なテーマであるため、現在、ショウジョウバエを用いて、新規の WNK 関連因子を探索しており、得られた系統の解析から、WNK シグナル伝達経路の制御機構の解明、さらには発症メカニズムの解明へとつなげて行きたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Sato, A. and Shibuya, H. (2013). WNK Signaling Is Involved in Neural Development via *Lhx8/Awh* Expression. *PLoS One*, 8: e55301. doi: 10.1371/journal.pone.0055301 査読有り。

(2) Goto, T., Sato, A. (these two authors contributed equally), Shimizu, M., Adachi, S., Satoh, K., Iemura, S., Natsume, T and Shibuya, H. (2013). IQGAP1 Functions as a Modulator of Dishevelled Nuclear Localization in Wnt Signaling. *PLoS One*, 8: e60865. doi: 10.1371/journal.pone.0060865 査読有り。

(3) Shimizu, M., Goto, T., Sato, A. (these three authors contributed equally) and Shibuya, H. (2013). WNK4 is an essential effector of anterior formation in FGF signaling. *Genes to Cells*, in press. doi: 10.1111/gtc.12048 査読有り。

〔学会発表〕（計 3 件）

（ 1 ） Atsushi Sato. A new downstream molecule, Awh is involved in the WNK signaling. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

（ 2 ） Atsushi Sato. A new downstream molecule, Awh is involved in the WNK signaling. Japanese Drosophila Research Conference 10. 2012 年 10 月 15 日、新橋

（ 3 ）佐藤 淳。Awh は WNK シグナル伝達経路の新規下流因子として機能する。第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 淳 (SATO ATSUSHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：30451925

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし